

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9677:2013**

**ISO 7847:1987**

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –  
XÁC ĐỊNH CÁC AXIT BÉO CHỨA BÃO HÒA ĐA  
CÓ CẤU TRÚC CIS,CIS 1,4-DIEN**

*Animal and vegetable fats and oils –*

*Determination of polyunsaturated fatty acids with a cis,cis 1,4-diene structure*

HÀ NỘI – 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 9677:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 7847:1987;

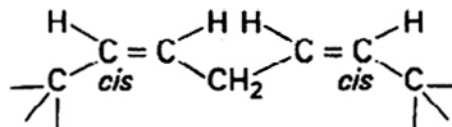
TCVN 9677:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2  
*Dầu mỡ động vật và thực vật* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường  
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Dầu mỡ động vật và thực vật – Xác định các axit béo chưa bão hòa đa có cấu trúc *cis,cis* 1,4-dien

*Animal and vegetable fats and oils – Determination of polyunsaturated fatty acids with a cis,cis 1,4-diene structure*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định các axit béo chưa bão hòa đa có cấu trúc *cis,cis* 1,4-dien có trong dầu mỡ động vật và thực vật, trong thực tế các axit béo của các dãy axit linolenic (9,12,15-octadecatrienoic) và axit linoleic (9,12-octadecadienoic) có  $\omega$ 3 và  $\omega$ 6 chưa bão hòa. Cấu trúc như sau:



Phương pháp này không áp dụng cho dầu và mỡ có chứa các axit béo chưa bão hòa đa  $\omega$ 8 và  $\omega$ 9 hoặc có chứa các axit béo mạch nhánh.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*

TCVN 6128 (ISO 661), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

#### 3.1

**Axit béo *cis,cis* 1,4-dien** (*cis,cis* 1,4-diene fatty acids)

Các axit béo xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

Các axit béo được biểu thị bằng phần trăm khối lượng mẫu thử.

### 4 Nguyên tắc

Xà phòng hóa phần mẫu thử ở nhiệt độ môi trường, tiếp theo giải phóng các axit béo. Oxy hóa các axit béo chứa cấu trúc *cis,cis* 1,4-dien bằng enzym. Đo độ hấp thụ của các axit đã oxy hóa, ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại (khoảng 235 nm), có bù độ hấp thụ do các axit chứa hai liên kết đôi liên hợp có sẵn trong mẫu.

### 5 Thuốc thử và vật liệu thử

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

#### 5.1 *n*-Hexan.

5.2 **Axit clohydric**, dung dịch,  $c(\text{HCl}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$ .

5.3 **Kali hydroxit**, dung dịch trong etanol,  $c(\text{KOH}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$ .

#### 5.3.1 Dung dịch gốc

Hòa tan 65 g kali hydroxit (KOH 86 %) trong khoảng 80 ml nước. Để nguội và thêm nước đến 100 ml.

#### 5.3.2 Chuẩn bị

Pha loãng 5 ml dung dịch gốc (5.3.1) đến 100 ml bằng etanol 95 % (thể tích).

Dung dịch này phải được chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

5.4 **Kali borat**, dung dịch đệm,  $c(\text{K}_3\text{BO}_3) = 1,0 \text{ mol/l}$  (pH = 9,0).

Hòa tan 61,9 g axit boric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) và 25,0 g kali hydroxit (KOH 86 %) trong khoảng 800 ml nước được đun nóng và khuấy. Để nguội đến nhiệt độ phòng, sau đó kiểm tra pH và điều chỉnh pH đến 9,0 bằng dung dịch axit clohydric hoặc dung dịch kali hydroxit, nếu cần. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml.

**5.5 Kali borat**, dung dịch đệm,  $c(\text{K}_3\text{BO}_3) = 2,0 \text{ mol/l}$  ( $\text{pH} = 9,0$ ).

Pha loãng 200 ml dung dịch kali borat 1,0 mol/l (5.4) bằng nước đến 1 000 ml. Làm nguội bằng đá lạnh.

**5.6 Lipoxidase**, dung dịch pha loãng.

**5.6.1 Lipoxidase**, có hoạt độ ít nhất là 50 000 đơn vị trên miligam (một đơn vị hoạt độ được xác định bằng lượng enzym oxy hóa  $1,2 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$  axit linoleic mỗi phút trong các điều kiện thử nghiệm).

Ở trạng thái đông khô, khi được giữ ở nhiệt độ  $-18^\circ\text{C}$  hoặc thấp hơn thì enzym này có thể bền được vài năm.

CHÚ THÍCH: Các chế phẩm enzym có hoạt độ riêng thấp có thể cho các kết quả thấp hơn thực tế. Các chế phẩm có hoạt độ riêng rất cao cũng không cho kết quả tốt hơn so với loại có hoạt độ từ 50 000 đơn vị đến 100 000 đơn vị trên miligam.

**5.6.2 Dung dịch gốc**

Hòa tan một lượng dung dịch enzym (5.6.1) tương đương với khoảng 650 000 đơn vị hoạt độ trong 10 ml dung dịch đệm kali borat 0,2 mol/l (5.5) được làm lạnh trên đá lạnh.

Dung dịch gốc khi được giữ ở  $-18^\circ\text{C}$  hoặc thấp hơn thì có thể bền trong một khoảng thời gian dài.

**5.6.3 Chuẩn bị**

Trộn 2 ml dung dịch gốc (5.6.2) với 8 ml dung dịch đệm kali borat 0,2 mol/l (5.5) đã làm nguội bằng đá lạnh.

**5.7 Lipoxidase**, dung dịch đã khử hoạt tính

Chuyển vài mililit dung dịch lipoxidase loãng (5.6) vào ống nghiệm, không để dung dịch dính vào thành của ống nghiệm. Ngâm ống nghiệm trong nồi cách thủy đun sôi (6.6) ít nhất 5 min, không để bề mặt của dung dịch thấp hơn bề mặt của nồi cách thủy.

**5.8 Dầu đối chứng**, ví dụ dầu hạt bông hoặc dầu hạt hướng dương, đã biết hàm lượng axit béo chưa bão hòa đa (được xác định chính xác bằng sắc ký khí lỏng và được biểu thị bằng phần trăm khối lượng của dầu đối chứng) với các axit béo chưa bão hòa đa được coi là bao gồm toàn bộ các axit béo có cấu trúc *cis,cis* 1,4-dien.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng trilinolein không chứa các đồng phân hình học và đồng phân đối quang làm chất đối chứng.

**5.9 Nitơ**, độ tinh khiết tối thiểu 99,5 % (khối lượng).

## 6 Thiết bị, dụng cụ

Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được làm sạch kỹ.

## **TCVN 9677:2013**

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

- 6.1 Bình định mức**, có nắp đậy, dung tích 100 ml.
- 6.2 Pipet**, dung tích 1 ml, 10 ml và 20 ml.
- 6.3 Pipet chia độ**, dung tích 1 ml và 10 ml.
- 6.4 Ống nghiệm**, có nắp đậy, dung tích 10 ml, khô hoàn toàn. Cách khác (xem Chú thích 1, trong 9.6.2) có thể dùng các cuvet sắc kí (xem 6.8) có nắp đậy.
- 6.5 Máy li tâm**, có các ống li tâm dung tích 10 ml.
- 6.6 Nồi cách thủy**, đun sôi.
- 6.7 Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 6.8 Máy đo phổ**, có thể đo độ hấp thụ ở bước sóng khoảng 235 nm, được trang bị các cuvet silica dày 10 mm.
- 6.9 Cân phân tích**.

## **7 Lấy mẫu**

Xem TCVN 2625 (ISO 5555).

## **8 Chuẩn bị mẫu thử**

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661).

## **9 Cách tiến hành**

### **9.1 Phép thử kiểm tra**

Nên phân tích song song mẫu dầu đối chứng đã biết trước hàm lượng các axit béo chưa bão hòa đa (5.8) với mẫu thử để kiểm tra quy trình.

### **9.2 Phần mẫu thử**

Cân 50 mg đến 200 mg mẫu thử (Điều 8), chính xác đến 0,1 mg, (tùy thuộc vào lượng axit béo chưa bão hòa đa dự kiến) cho vào bình định mức 100 ml (6.1) được dán nhãn A.

**CHÚ THÍCH** Khi lượng mẫu được lấy tương đương với 10 mg đến 80 mg axit béo chưa bão hòa đa thì độ hấp thụ tối đa sẽ nằm trong dải từ 0,07 đến 0,5.

### 9.3 Xà phòng hóa

Dùng pipet (6.2) chuyển 10 ml dung dịch kali hydroxit trong etanol (5.3) vào bình cầu và loại bỏ không khí trong bình bằng nitơ (5.9). Đậy kín bình và bảo quản ở nơi tối, để quá trình xà phòng hóa diễn ra ít nhất 4 h, thỉnh thoảng lắc bình để trộn các thành phần.

Nếu mẫu có điểm nóng chảy cao hơn nhiệt độ phòng, thì nên làm ấm bình cầu cùng với mẫu (sau khi đã đậy bình) khoảng vài phút trong nồi cách thủy (6.7) ở  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  để tăng tốc độ xà phòng hóa.

CHÚ THÍCH: Quy trình xà phòng hóa khác được quy định trong Phụ lục A đặc biệt thích hợp cho phép phân tích lặp lại nhiều mẫu.

### 9.4 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Sau khi quá trình xà phòng hóa hoàn thành, dùng pipet thích hợp (6.2) thêm 20 ml dung dịch đệm kali borat 1,0 mol/l (5.4) và 10 ml axit clohydric (5.2) vào bình A. Thêm nước đến vạch 100 ml. Đậy nắp bình và trộn các thành phần bằng cách đảo ngược nhẹ bình vài lần, giữ cho việc tạo bọt là ít nhất. Nếu cần, điều chỉnh lại thể tích đến 100 ml sau khi trộn. Nếu kết tủa xảy ra ở giai đoạn này thì chuyển vài mililit dung dịch đã trộn vào ống li tâm (6.5) và làm lắng chất kết tủa.

Dùng pipet (6.2) chuyển 1 ml lượng chứa trong bình A (hoặc 1 ml chất lỏng nổi phía trên từ dung dịch li tâm) cho vào bình 100 ml khác (6.1) được dán nhãn là B, đã được làm sạch trước bằng nitơ (5.9). Khi dự kiến mẫu có chứa lượng axit béo chưa bão hòa đa rất nhỏ thì chuyển từ 2 ml đến 4 ml vào bình B thay vì chuyển 1 ml.

Dùng pipet (6.2) chuyển 20 ml dung dịch đệm kali borat 1,0 mol/l (5.4) vào bình B và thêm nước đến vạch 100 ml. Đậy nắp bình và trộn lượng chứa trong bình, giảm thiểu việc tạo bọt (xem Chú thích). Độ đục nhẹ ở giai đoạn này sẽ không cản trở phép đo tiếp theo.

CHÚ THÍCH: Sau khi xà phòng hóa, thu được dung dịch loãng của xà phòng. Nồng độ xà phòng trong bình A ở khoảng 1 mg/ml và trong bình B khoảng 10 µg/ml. Nồng độ xà phòng trong bọt cao hơn trong dung dịch. Nếu bọt bám vào pipet khi dung dịch chuyển từ bình này sang bình khác thì có thể làm mất đi một lượng không xác định các axit béo.

### 9.5 Phép thử kiểm tra sự phù hợp

Thực hiện phép thử kiểm tra sự phù hợp song song với phép xác định (9.7), sử dụng cùng quy trình nhưng dùng 0,1 ml dung dịch lipoxidase đã khử hoạt tính (5.7) thay cho dung dịch lipoxidase loãng (5.6) để chuẩn bị dung dịch bù mẫu.

## **9.6 Hiệu chuẩn**

### **9.6.1 Chuẩn bị dãy dung dịch hiệu chuẩn**

Cân một lượng dầu đối chứng tương ứng với khoảng 100 mg axit béo chưa bão hòa đa, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml (6.1). Xà phòng hóa và định mức như quy định trong 9.3 và đoạn đầu trong 9.4.

Dùng pipet chia độ (6.3) chuyển 10 ml dung dịch vào bình định mức 100 ml (6.1) thứ hai, thêm 18 ml dung dịch đệm kali borat 1,0 mol/l (5.4) và thêm nước đến vạch 100 ml.

Dùng pipet chia độ (6.3) chuyển 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml và 10 ml từ bình thứ hai này vào dãy sáu bình định mức 100 ml (6.1) và thêm dung dịch đệm kali borat 0,2 mol/l (5.5) đến vạch 100 ml.

### **9.6.2 Oxy hóa bằng enzym**

Sử dụng pipet chia độ 1 ml (6.3) chuyển 0,1 ml dung dịch lipoxidase loãng (5.6) vào dãy sáu ống nghiệm (6.4) (xem Chú thích 1). Sau đó cho vào từng ống nghiệm 3 ml dung dịch hiệu chuẩn (mỗi dung dịch pha loãng cho mỗi ống nghiệm) và lắc nhẹ để đảm bảo dung dịch được trộn đều (xem Chú thích 2).

Để yên ống nghiệm khoảng 20 min đến 30 min.

CHÚ THÍCH 1: Quy trình oxy hóa có thể thực hiện trong cuvet đo phổ dày nắp (xem 6.8) để tránh việc chuyển dung dịch vào cuvet trước khi đo độ hấp thụ.

CHÚ THÍCH 2: Việc xử lý các thành phần trong ống nghiệm là rất quan trọng. Sau khi đã trộn đều các thành phần thì không trộn thêm. Việc trộn thêm sẽ làm tăng kết quả độ hấp thụ của dung dịch hiệu chuẩn, dung dịch bù mẫu và dung dịch thử. Nhìn chung, không thể kiểm tra giá trị đo được chính xác hay không nếu dung dịch được đổ ra khỏi cuvet và được thay sau đó. Chưa xác định được nguyên nhân làm tăng độ hấp thụ của các dung dịch nêu trên. Do đó, mỗi phòng thử nghiệm cần thực hiện đúng quy trình đã quy định.

### **9.6.3 Đo phổ**

Chuyển các lượng chứa trong mỗi ống nghiệm vào từng cuvet silica riêng rẽ (xem 6.8). Sử dụng máy đo phổ (6.8), đo độ hấp thụ của từng dung dịch hiệu chuẩn ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại (khoảng 235 nm) sử dụng dung dịch bù mẫu (xem 9.5) để điều chỉnh thiết bị về "0". Lấy kết quả trung bình của hai lần đọc độ hấp thụ đối với từng dung dịch hiệu chuẩn.

### **9.6.4 Dựng đường chuẩn**

Dựng đồ thị các giá trị trung bình của độ hấp thụ theo khối lượng của các axit béo chưa bão hòa đa tính được từ các thành phần đã biết của dầu đối chứng.

Vẽ đường thẳng qua các điểm đã đánh dấu; đi qua gốc tọa độ.



## 9.7 Phép xác định

### 9.7.1 Oxy hóa bằng enzym

Dùng pipet chia độ 1 ml (6.3) chuyển 0,1 ml dung dịch lipoxidase loãng (5.6) vào ống nghiệm (6.4) (xem Chú thích 1 trong 9.6.2). Sau đó thêm 3 ml dung dịch thử (9.4) từ bình B vào ống nghiệm và lắc nhẹ để đảm bảo dung dịch được trộn đều (xem Chú thích 2 trong 9.6.2).

Để yên ống nghiệm khoảng 20 min đến 30 min.

### 9.7.2 Đo phổ

Chuyển lượng chứa trong ống nghiệm vào cuvet silica (xem 6.8). Sử dụng máy đo phổ (6.8) đo độ hấp thụ của dung dịch thử ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại (khoảng 235 nm) sử dụng dung dịch bù mẫu (xem 9.5) để chỉnh thiết bị về "0". Tính giá trị trung bình của hai lần đọc độ hấp thụ và đọc khối lượng của các axit béo từ đồ thị chuẩn (9.6.4).

**CHÚ THÍCH** Chỉnh về "0" sử dụng dung dịch bù mẫu để bù cho độ hấp thụ do các axit chứa hai liên kết đôi liên hợp ban đầu có trong mẫu. Giá trị độ hấp thụ của dung dịch bù mẫu phải được kiểm tra dựa vào nước bởi vì nếu dựa vào dung dịch thử thì sẽ làm giảm độ chụm.

## 9.8 Số lượng phép xác định

Tiến hành hai phép xác định trên cùng một mẫu thử.

## 10 Biểu thị kết quả

### 10.1 Phương pháp tính toán

Hàm lượng các axit béo chưa bão hòa đa, biểu thị bằng phần trăm phần khối lượng, tính được theo công thức sau:

$$\frac{m_1 \times 100}{V \times m_0}$$

Trong đó:

$m_0$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

$m_1$  là khối lượng của axit béo chưa bão hòa đa đọc được từ đồ thị chuẩn, tính bằng miligam (mg);

$V$  là thể tích của dung dịch lấy ra từ bình A, tính bằng mililit (thường là 1 ml).

**CHÚ THÍCH** Kết quả thu được theo cách này được biểu thị theo dầu hoặc mỡ toàn phần và không biểu thị theo tổng các axit béo có trong dầu hoặc mỡ.

**10.2 Độ lặp lại**

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép xác định tiến hành nhanh, liên tiếp do một người thực hiện, trong cùng một điều kiện, trên cùng một mẫu thử, không được quá 3,5 % (khối lượng) (giá trị tuyệt đối) của các axit béo chưa bão hòa đa trong dải từ 10 % đến 70 % (khối lượng).

**11 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được, chỉ rõ phương pháp biểu thị đã sử dụng. Báo cáo thử nghiệm cũng phải đề cập đến các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

**Phụ lục A**

(Quy định)

**Quy trình xà phòng hóa khác**

Hòa tan phần mẫu thử (9.2) trong vài mililit *n*-hexan (5.1) sau đó thêm *n*-hexan đến vạch và trộn. Dùng pipet (6.2) chuyển 1,0 ml dung dịch vào bình định mức 100 ml (6.1) (bình B), đã được làm sạch trước bằng nitơ. Khi dự kiến mẫu chứa lượng axit béo chưa bão hòa đa rất nhỏ thì chuyển từ 2 ml đến 4 ml thay cho 1 ml vào bình B. Làm bay hơi hoàn toàn dung môi bằng dòng khí nitơ nhẹ.

Thêm 2 ml dung dịch kali hydroxit trong etanol (5.3) vào mẫu không chứa dung môi trong bình B và đậy nắp bình. Để bình ở nơi tối cho quá trình xà phòng hóa xảy ra trong khoảng 4 h. Tiến hành tiếp theo như trong 9.7.

---